

Doktori értekezés tézisei

**A dSAGA SPECIFIKUS HISZTON ACETILÁCIÓ  
GÉN MŰKÖDÉS SZABÁLYOZÁSBAN BETÖLTÖTT  
FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA**

**Zsindely Nóra**



Témavezető:  
Dr. Boros Imre Miklós  
tanszékvezető egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

2013.

## BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtek működéséhez nélkülözhetetlen a genom nagymértékű, ugyanakkor dinamikus összetömörítése. Ezt a különböző fehérje faktorok közreműködésével létrejövő kromatinszerkezet biztosítja, amely alapegységeit a hiszton (H2A, H2B, H3, H4) fehérjékre feltekeredő 147 bázispárnyi DNS-ből felépülő nukleosómák alkotják. A tömörödés különböző szintjei eltérő mértékű hozzáférhetést biztosítanak a DNS szálon lezajló folyamatokat (transzkripció, DNS replikáció és hibajavítás) végző faktorok számára. Így a kromatinszerkezet tömörsége, illetve annak dinamikus átalakítását végző mechanizmusok fontos szabályozó szerepet töltenek be a transzkripció folyamata során. A kromatinszerkezet dinamikus átalakításáért felelős mechanizmusok egyike a nukleosómális hiszton fehérjéken megjelenő poszttranszlációs módosítások. Az egyik, intenzíven tanulmányozott ilyen módosítás a hiszton fehérjék acetilációja. A nukleosómák hiperacetilált állapota egy nyitottabb, míg a hipoacetilált nukleosómák egy tömörebb kromatinszerkezettel hozhatók összefüggésbe. Számos megfigyelés alapján az aktív transzkripció folyamatához egy hiperacetilált, nyitott kromatin szerkezet köthető, viszont az acetiláció szabályozó szerepének pontos részletei még kevésbé ismertek. Ezek felderítéséhez nagymértékben hozzájárulnak a hiszton acetiltransferáz (HAT) enzimek vizsgálata során nyert információk. Az egyik legjobban jellemzett HAT aktivitású fehérje a Gcn5, amely több alegységes fehérje komplex tagjaként látja el acetilációs funkcióját. A Gcn5-tartalmú HAT komplexek ADA-típusú adaptor fehérjéket is tartalmaznak, amelyek a Gcn5 fehérje aktivitásának és specifikitásának meghatározásában játszanak szerepet. A *Drosophila melanogaster*-ben előforduló egyik Gcn5-tartalmú HAT komplex, a dSAGA acetilációs moduljának egyik alegysége a dADA2b fehérje, amely szükséges a komplex H3 hiszton 9-es és 14-es lizinjére specifikus acetilációs aktivitásához. Az ADA2 fehérjék sokszínű funkciójára utal, hogy a *Drosophila Ada2b* génről több mRNS és fehérje izoforma termelődik. A két dADA2b fehérje izoforma N-terminális régiója azonos, mindkettő tartalmaz egy-egy, az ADA2

fehérjékre jellemző ZZ cink-ujj és SANT domént, viszont a C-terminális régió eltérő. Itt, az ADA2 fehérjékre specifikus ADA motívumból a rövidebb izoformában (dADA2bS) csak kettő, míg a hosszabb izoformában (dADA2bL) három darab található meg. Mivel ezeknek az ADA motívumoknak feltételezhetően az ADA2 fehérjék más komplex alegységekkel kialakított kölcsönhatásaik létrejöttében fontos szerepe lehet, az eltérő számú ADA motívumot tartalmazó dADA2b izoformák más folyamatok szabályozásában betöltött szerepét feltételezhetjük.

A dolgozatomban a teljes dADA2b funkciót eltávolító (*dAda2b<sup>842</sup>*) deléció, valamint a rövid dADA2bS izoformát kifejező transzgenikus törzsek alkalmazásával megvizsgáltam, hogy a dADA2b fehérjéken keresztül a dSAGA acetilációs aktivitása hogyan járul hozzá a génműködés szabályozásához.

## CÉLKITŰZÉSEK

Dolgozatomban a dSAGA specifikus hiszton acetilációnak a génműködés szabályozásában betöltött szerepét vizsgálom, amelyhez a következő kérdésekkel foglalkozom:

### **1. Késői L3 lárva és korai báb állapotban mely gének expresszióját szabályozza a dSAGA specifikus acetiláció?**

- *dAda2b* mutáns egyedek teljes transzkriptum analízise késői L3 lárva és korai báb állapotban

### **2. A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység két izoformája hogyan járul hozzá a dSAGA génműködés szabályozásában betöltött funkciójához?**

- A dADA2b izoformák expressziójának, valamint a dADA2b rövid izoforma funkciójának vizsgálata

### **3. A dSAGA komplex és az általa létrehozott H3K9 acetiláció közvetlenül befolyásolja-e a 2.1-es pont alapján dSAGA-függő transzkripciót mutató gének expresszióját?**

- A dADA2b fehérje kötődésének, valamint a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szintjének meghatározása dSAGA-függő és dSAGA-független transzkripciójú gének különböző régióin

### **4. A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció miként befolyásolja a génaktiváció folyamatát?**

- A dSAGA specifikus H3K9 acetilációs mintázat és ennek transzkripcióra kifejtett hatásának feltérképezése az *Eip74EF* és *Eip75B* ekdizon indukált gének aktivációja során

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- *dAda2b*<sup>842</sup> mutáns, valamint dADA2bS izoformát kifejező transzegenikus *Drosophila* lárvák transzkriptom vizsgálata DNS microarray módszerrel
- Különböző dADA2b izoformákat kifejező transzegenikus *Drosophila* vonalak vizsgálata
- H3K9 acetiláció szintjének meghatározása immunhisztokémiai festéssel nyálmirigy óriáskromoszóma preparátumokon
- H3K9 acetiláció és dADA2b fehérjék expressziójának meghatározása Western blot analízissel
- Apoptózis kimutatása acridine orange festéssel
- H3K9 acetiláció szintjének meghatározása több genomi régióban kromatin immunprecipitációval
- Génexpresszió szintjének mérése kvantitatív real-time PCR-rel

# EREDMÉNYEK

## 1. A dSAGA acetiltranszferáz komplex szabályozása alatt álló gének

Vad típusú és *dAda2b* mutáns egyedeken két fejlődési állapotban (késői L3 lárvá és korai báb állapot) teljes transzkriptum analízist végezve meghatároztuk, hogy mely gének expresszióját szabályozza a dSAGA komplex. A génexpressziós profilok összehasonlításával megállapítottuk, hogy a dADA2b fehérjék hiányában mindkét fejlődési állapotban a gének csak egy kis részének (kb. 5 %) a kifejeződése tér el a vad típusétól. Az acetiláció szerepéről eddig kialakított képtől eltérően ezen dSAGA-függő géneknek több mint a fele nem csökkent, hanem emelkedett mértékű expressziót mutatott a dSAGA specifikus acetiláció hiányában. Mind a két vizsgált fejlődési állapotban hasonló funkcióval rendelkező gének mutattak dADA2b-függő expressziót. A dADA2b fehérje stresszválasz szabályozásában betöltött funkciójára utalhat, hogy az emelkedett expressziójú gének között nagy számban találunk az immunfunkcióhoz valamint a mikroorganizmusok elleni védekezéshez kapcsolódó génontológiai csoportokba tartozó géneket.

## 2. A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység rövid izoformájának szerepe a dSAGA működésében

Előzetes kísérleti adatok azt mutatták, hogy a *dAda2b* génről kétféle mRNS és fehérje izoforma képződik, így megvizsgáltuk, hogy a dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység ezen két izoformája hogyan járul hozzá a dSAGA génműködés szabályozásában betöltött funkciójához. Western blot analízisben kimutattuk, hogy mindkét dADA2b fehérje izoforma változó mennyiségben ugyan, de az egyedfejlődés minden szakaszában jelen van. Ezért megvizsgáltuk, hogy a dADA2b rövid izoforma önmagában hogyan képes ellátni a teljes dADA2b funkciót. Mind a *dAda2b* deléción okozta letalitás tekintetében, mind a dSAGA komplex acetilációs aktivitását, mind az apoptotikus folyamatok szabályozására kifejtett hatását tekintve a rövid dADA2b fehérje csak részlegesen tudta pótolni a dADA2b funkciót. Összességében elmondhatjuk, hogy a két dADA2b izoforma csak

a C-terminális régióban különbözik egymástól, funkcionálisan mégsem ekvivalensek.

A dADA2bS esetében tapasztalt részleges funkció háttérében azt feltételezhetjük, hogy a rövid izoforma jelenlétében létrejövő dSAGA komplex csak az egyik irányú génexpressziós változások szabályozásában képes részt venni. Ezért a dADA2bS izoformát kifejező, egyébként *dAda2b* mutáns lárvákon transzkriptum analízist végeztünk, amely során megállapítottuk, a dADA2bS fehérje jelenlétében létrejövő dSAGA komplex mind az emelkedett, mind a csökkent expressziójú gének szabályozásában részt vesz. Az emelkedett expressziót mutató gének 40%-ának az expresszióját visszaállította a vad típusban mért szintre, tehát megállapíthatjuk, hogy a represszió közvetítésében hatékonyabbnak bizonyult a rövid izoforma, viszont itt sem volt képes betölteni a teljes *dAda2b* funkciót. A dADA2b-függő gének több, mint felének szabályozásához a rövid izoforma önmagában nem volt elegendő, ezen gének megfelelő átírásához valószínűleg a dADA2bL fehérje, vagy mindkét izoforma egyidejű jelenlétére szükség lehet. Elképzelhető, hogy a dSAGA komplex a dADA2b izoformák segítségével valósít meg egy génspecifikus transzkripció szabályozást, de ez nem olyan formában történik, hogy a rövid izoforma jelenlétében a dSAGA komplex kizárólag aktiváló, vagy represszáló hatást lenne képes kifejteni.

### **3. A dSAGA komplex és az általa létrehozott H3K9 acetiláció szerepe a génexpresszió szabályozásában**

A dADA2b fehérje a dSAGA komplex hiszton acetilációt létrehozó moduljának egyik felépítő eleme, amely meghatározza a dGcn5 fehérje szubsztrát specificitását. Így megvizsgáltuk, hogy a dADA2b fehérjék hiányában megfigyelt expressziós változások közül mind a csökkent, mind pedig az emelkedett mértékű génexpresszió is a dADA2b acetilációt befolyásoló hatásához köthető-e. Ehhez *w<sup>1118</sup>* és *dAda2b* mutáns SpEv lárvákon végzett kromatin immunprecipitációs kísérletekben dSAGA-függő (emelkedett és csökkent expresszió), illetve dSAGA-független transzkripciót mutató géneken is meghatároztuk a dADA2b fehérje jelenlétét, valamint a H3K9 acetiláció szintjét. A dADA2b fehérje kötődése alapján több dSAGA-függő expressziót mutató gént (*sug*, *cnc*, *CycB*, *Hus1*) is direkt

dSAGA célként sikerült azonosítani. Mind a csökkent, mind az emelkedett expressziót mutató gének esetében is sikerült dADA2b kötődést kimutatnunk, ezek apalján mindkét irányú expressziós változás hátterében a dSAGA komplex közvetlen működése állhat. A dADA2b fehérje jelenléte nemcsak a gének promóterhez közeli részén, hanem a 3' végi régiójában is kimutatható volt. Ez a kötődési mintázat hátterében állhat az, hogy a dSAGA komplex nem csak a transzkripció iniciációs, hanem elongációs lépését is szabályozhatja, és így a gének teljes átírt régióján megjelenik a dSAGA komplex.

A dSAGA-függő expressziót mutató gének H3K9 acetilációs szintjét megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy mind a csökkent (*sug*, *cnc*, *CycB*), mind az emelkedett (*Fst*, *Hus1*, *AttD*) expressziójú gének területén megjelent a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció. Ezen adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a promóterhez közeli régióban a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció jelenléte számos gén szabályozása során esszenciális, viszont a transzkripció folyamata során nem csak aktiváló, hanem represszálo hatás kialakításához is közvetlenül hozzájárulhat.

#### **4. A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szerepe a génaktiváció folyamatában**

Hogy megtudjuk, a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hogyan járul hozzá a génaktiváció folyamatához, feltérképeztük a génaktiváció során az acetiláció szintjét, valamint annak az adott gén transzkripciójára kifejtett hatását is. A nyálmirigy óriáskromozómákon elvégzett immunfestés során megállapítottuk, hogy a dSAGA specifikus hiszton acetiláció nem kizárólagos előfeltétele a hőszokk gének aktivációjának, ugyanis az átírást végző RNS polimeráz csökkent H3K9 acetiláció mellett is képes az aktivált hőszokk génekhez kötődni.

Az acetiláció szerepének részletesebb tanulmányozásához az ekdizon hormon által indukált *Eip74EF* és *Eip75B* korai gének vizsgálatát választottuk eszközznek. Először feltérképeztük ezen gének aktivációs profiljait, majd az ezek alapján a génaktivációt kísérő acetilációs mintázat vizsgálatához kiválasztottunk egy indukció előtti és két indukció alatti időpontot. Ezekben az időpontokban kromatin immunprecipitációs kísérlettel meghatároztuk a H3K9 acetiláció mennyiségét a gének promóter, promóterhez közeli intronikus, valamint 3' véghez közeli exonikus



régióiban. Az elvégzett ChIP kísérlet eredménye azt sugallja, hogy a H3K9 acetiláció a vizsgált régiókban egy általánosan jelen lévő hiszton módosítás, ami nem mutat kifejezett régió specificitást. A génaktiváció folyamatával kapcsolatban egyedül az adott promóterek működésének megfelelően a promóterekhez közeli régiókban csak enyhe emelkedést, de nem kizárólagos megjelenést mutatott a H3K9 acetiláció mennyisége. *dAda2b* mutáns vándorló L3 stádiumú lárvákon (wL3) elvégzett kromatin immunprecipitációs kísérletekből megállapítottuk, hogy a dSAGA komplex felelős az *Eip74EF* és *Eip75B* gének esetében általánosan megjelenő H3K9 acetilációs mintázat létrehozásáért.

Megvizsgáltuk, hogy ez a dSAGA specifikus általános acetilációs mintázat hozzájárul-e az *Eip74EF* és *Eip75B* gének expressziójának szabályozásához, melyhez megmértük a dADA2b fehérjék hiányában az *Eip74EF* és *Eip75B* gének promótereiről képződő nascens RNS-ek mennyiségét. Ennek során megállapítottuk, hogy a kisebb mértékben aktiválódó *Eip74EF-RB* és *Eip75B-RC* promóterek indukciója a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiányában csak kevésbé sérül, míg az erőteljes indukciót mutató *Eip74EF-RA* promóter aktivációja elmarad. Tehát az *Eip74EF* és *Eip75B* gének területén általánosan jelen lévő dSAGA specifikus H3K9 acetilációs mintázat fontos szabályozó szereppel bír ezen gének aktivációjának szabályozásában.

## ÖSSZEFOGLALÁS

### **A dSAGA specifikus hiszton acetiláció feltételezett funkciója a génműködés szabályozásában**

A dolgozatomban részletezett eredmények is rámutatnak, hogy a dSAGA HAT komplex rendkívül összetett módon járulhat hozzá a génműködés szabályozásához. Egyrészt transzkripciót szabályozó fehérjékkel közvetlenül kölcsönhatva szerepet játszhat egy irányított, helyspecifikusan megjelenő acetilációs létrehozásában, másrészt részt vesz egy általánosan megjelenő acetilációs alapmintázat fenntartásában is. Ez a kétféle acetiláció nem egymástól függetlenül jelentkezik, hanem egy dinamikusan változó acetilációs háttéren jelenhet meg egy irányított, helyspecifikus acetiláció. A dSAGA elégtelen működése következtében sérülhet ez az acetilációs háttér, amelynél gyengülhet a szabályozó fehérjék kromatinhoz való kötődési képessége, és ezáltal – attól függően, hogy aktivátor vagy represszor hatású fehérjéről van szó – módosulhat az általuk szabályozott gének működése. Ezenfelül ez az általánosan megjelenő, dinamikusan változó acetilációs alapmintázat hozzájárulhat a génszabályozás megfelelő kinetikájához is. Tehát a dSAGA komplex acetilációs aktivitása közvetett módon is, egy transzkripciót megengedő kromatinszerkezet fenntartásán keresztül is hozzájárul a génműködés szabályozásához.

## KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

Pankotai T\*, **Zsindely N\***, Vamos EE, Komonyi O, Bodai L, Boros IM.  
Functional characterization and gene expression profiling of *Drosophila melanogaster* short dADA2b isoform-containing dSAGA complexes.  
*BMC Genomics* 2013 14:(1) p. 44. (in press)  
**IF (2011): 4,073**

Bodai L, **Zsindely N**, Gáspár R, Kristó I, Komonyi O, Boros IM.  
Ecdysone induced gene expression is associated with acetylation of histone H3 lysine 23 in *Drosophila melanogaster*.  
*PLoS One*. 2012; 7(7):e40565.  
**IF (2011): 4,092**

**Zsindely N\***, Pankotai T\*, Ujfaludi Z, Lakatos D, Komonyi O, Bodai L, Tora L, Boros IM.  
The loss of histone H3 lysine 9 acetylation due to dSAGA-specific dAda2b mutation influences the expression of only a small subset of genes.  
*Nucleic Acids Res.* 2009. 37(20):6665-80.  
**IF: 7,479**

\* Osztott elsőszerző

### Egyéb publikáció:

Pankotai T, Popescu C, Martín D, Grau B, **Zsindely N**, Bodai L, Tora L, Ferrús A, Boros IM  
Genes of the ecdysone biosynthesis pathway are regulated by the ATAC histone acetyltransferase complex in *Drosophila*  
*Mol Cell Biol.* 2010 30(17):4254-66.  
**IF: 6,188**

**Összesített impakt faktor: 21,832**

### Konferencia összefoglalók, poszterek:

9th EMBL Conference Transcription and Chromatin  
2010. augusztus 28-31. Heidelberg, Németország  
N Zsindely, T Pankotai, C Popescu, L Bodai, IM. Boros  
*The Drosophila GCN5 containing dSAGA and dATAC complexes have markedly different transcriptional effects*  
(Poster presentation)

Epigenetic World Congress

2009. IX. 17-18. Berlin, Németország

Zsindely N, Pankotai T, Bodai L, Tora L, Boros IM

*Loss of the dSAGA subunit dADA2b influences the expression of a small subset of genes*

(Poster presentation)

33<sup>rd</sup> FEBS Congress and 11<sup>th</sup> IUBMB Conference,

2008. június 28.-július 3. Athén, Görögország

N. Zsindely, T. Pankotai, Z. Ujfaludi, O. Komonyi, D. Lakatos, C. Thibault, L.

Tora and I. Boros

*The role of dADA2b proteins in dSAGA*

(Poster presentation)

Spetses Summer School Chromatin & Transcription

2008. szeptember 3-8. Spetses, Görögország

N Zsindely, T Pankotai, Zs Ujfaludi, O Komonyi, D Lakatos, C Thibault, L

Tora and I M Boros

*The role of dADA2b proteins in dSAGA*

(Poster presentation)

Genetikai Műhelyek Magyarországon minikonferencia

2008. szeptember 12. Szeged

Zsindely Nóra

*Különböző adaptor izoformák a SAGA hiszton acetiláló komplexben*

(Oral presentation)